

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/08418
02.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 3月17日

出願番号
Application Number: 特願2003-071760
[ST. 10/C]: [JP2003-071760]

RECD 22 AUG 2003
WIPO PCT

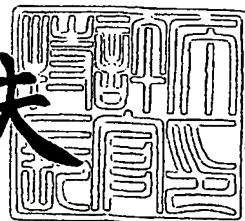
出願人
Applicant(s): 早出 広司

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 PSD-0018
【提出日】 平成15年 3月17日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N
【発明者】

【住所又は居所】 東京都目黒区南1-13-16
【氏名】 早出 広司

【特許出願人】

【識別番号】 596153357
【氏名又は名称】 早出 広司

【代理人】

【識別番号】 100105991
【弁理士】
【氏名又は名称】 田中 玲子
【電話番号】 03-5521-1530

【選任した代理人】

【識別番号】 100106840
【弁理士】
【氏名又は名称】 森田 耕司
【電話番号】 03-5521-1530

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-196177
【出願日】 平成14年 7月 4日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 112462
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グルコース脱水素酵素

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対する高い選択性を有する改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 2】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 P Q Q G D H の第 1 8 6 残基から第 2 0 6 残基の領域または他の種における同等の領域において 1 またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 3】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性 P Q Q G D H の 1 9 2 番目のグルタミン残基もしくは他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 4】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 1 9 2 番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 5】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 1 9 2 番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている、請求項 4 記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 6】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 1 9 2 番目のグルタミン残基と 1 6 7 番目のアスパラギン酸残基が同時に他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項 7】 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 1 6 7 番目のアスパラ

ギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている、請求項6記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項8】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている、請求項6記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項9】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項10】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項9記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項11】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている、請求項9記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項12】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項13】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請

求項12記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項14】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている、請求項12記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項15】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの193番目のロイシン残基もしくは他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項16】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の193番目のロイシン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項17】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の193番目のロイシン残基がアラニン残基またはグリシン残基で置換されている、請求項16記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項18】 ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列

Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

(式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がGlnであるときXaa2はLeuではない)

を含むことを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項19】 Xaa1がAla、Gly、Glu、Leu、Phe、SerまたはAspであり、Xaa2がAlaまたはGlyである、請求項18記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項20】 請求項1-19のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

【請求項21】 請求項20に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項22】 請求項20に記載の遺伝子を含む形質転換体。

【請求項23】 請求項20に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている

、請求項22記載の形質転換体。

【請求項24】 請求項1-19のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

【請求項25】 請求項1-19のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素 (PQQGDH) の製造、およびグルコースの定量におけるその使用に関する。

【0002】

【従来の技術】

血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーである。また、微生物を用いる発酵生産においては、プロセスをモニタリングするためにグルコース濃度を定量する。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ (GOD) あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素 (G6PDH) を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するためカタラーゼあるいはパーオキシダーゼをアッセイ系に添加する必要があった。G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD (P) を添加しなければならない。

【0003】

そこで、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてPQQGDHの応用が注目されている。PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。

【0004】

PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。例えば、AM. Clet

o n - J a n s e n e t a l . , J . B a c t e r i o l . (1 9 9 0) 1 7 2 , 6 3 0 8 - 6 3 1 5 を 参 照 さ れ た い 。 一 方 、 水 溶 性 P Q Q G D H は *Acinetobacter calcoaceticus* の い く つ か の 株 に お い て そ の 存 在 が 確 認 さ れ て お り (B i o s c i . B i o t e c h . B i o c h e m . (1 9 9 5) , 5 9 (8) , 1 5 4 8 - 1 5 5 5) 、 そ の 構 造 遺 伝 子 が ク ロ ー ニ ン グ さ れ ア ミ ノ 酸 配 列 が 明 ら か に さ れ て い る (M o l . G e n . G e n e t . (1 9 8 9) , 2 1 7 : 4 3 0 - 4 3 6) 。 *A. calcoaceticus* 由 来 水 溶 性 P Q Q G D H は 、 分 子 量 約 5 0 k D a の ホ モ ダ イ マ ー で あ る 。 他 の P Q Q 酵 素 と は 蛋 白 質 の 一 次 構 造 上 で の ホ モ ロ ジ ー が ほ と ん ど な い 。

【0005】

最 近 、 *Acinetobacter calcoaceticus* 由 来 の 水 溶 性 P Q Q G D H の X 線 結 晶 構 造 解 析 の 結 果 が 報 告 さ れ 、 活 性 中 心 を は じ め と し た 本 酵 素 の 高 次 構 造 が 明 ら か と な っ た 。 (A. Oubrie e t a l . , J . M o l . B i o l . , 2 8 9 , 3 1 9 - 3 3 3 (1 9 9 9) ; A. Oubrie e t a l . , T h e E M B O J o u r n a l , 1 8 (1 9) 5 1 8 7 - 5 1 9 4 (1 9 9 9) ; A. Oubrie e t a l . P N A S , 9 6 (2 1) , 1 1 7 8 7 - 1 1 7 9 1 (1 9 9 9)) 。 こ れ ら の 論 文 に よ れ ば 、 水 溶 性 P Q Q G D H は 6 つ の W - モ チ ーフ か ら 構 成 さ れ る β プ ロ ペ ラ 蛋 白 質 で あ る こ と が 明 ら か と な っ た 。

【0006】

P Q Q G D H は グ ル コ ラ ス に 対 し て 高 い 酸 化 活 性 を 有 し て い る こ と 、 お よ び P Q Q G D H は 補 酵 素 結 合 型 の 酵 素 で あ る た め 電 子 受 容 体 と し て 酸 素 を 必 要 と し な い こ と か ら 、 グ ル コ ラ ス セン サ ー の 認 識 素 子 を は じ め と し て 、 ア ッ セ イ 分 野 へ の 応 用 が 期 待 さ れ て い る 。 し か し な が ら P Q Q G D H は グ ル コ ラ ス に 対 す る 選 択 性 が 低 い こ と が 問 題 で あ っ た 。

【0007】

本 発 明 に 関 連 す る 先 行 技 術 文 献 情 報 と し て は 以 下 の も の が あ る 。

【特許文献1】

特開2001-346587

【特許文献2】

特開2001-197888

【非特許文献1】

Mol. Gen. Genet. (1989), 217:430-436

【非特許文献2】

A. Oubrie, et al. (1999) J. Mol. Biol. , 289, 319-333

【非特許文献3】

A. Oubrie, et al. (1999) The EMBO Journal, 18(19), 5187-5194

【非特許文献4】

A. Oubrie, et al. (1999), PNAS 96(21), 11787-11791

【0008】**【発明が解決しようとする課題】**

したがって本発明は、グルコースに対する選択性が高い改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

【0009】**【課題を解決するための手段】**

本発明者は水溶性PQQGDHを遺伝子工学的に改良してそのグルコースに対する選択性を高め、臨床検査や食品分析などに応用できる改変型PQQGDHを開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、グルコースに対する選択性が高い酵素を得ることに成功した。

【0010】

すなわち、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対する高い選択性を有する改変型グルコース脱水素酵素を提供する。本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対して高い選択性を有する。好ましくは本発明の改変型PQQGDHは、グルコースに対する反応性と比べて、ラクトースあるいはマルトースに対する反応性が野生型より低下している。より好ましくは、グルコースに対する反応性を100%とした場合、ラクトース

あるいはマルトースに対する活性が50%以下であり、より好ましくは40%以下であり、さらに好ましくは30%以下である。

【0011】

本発明の1つの態様においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基（すなわち天然に存在するPQQグルコース脱水素酵素中の対応するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基）で置換されている。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを1として番号付けする。

【0012】

本明細書においてアミノ酸残基の位置または領域に関して用いる場合、「同等の」との用語は、構造上類似するが同一ではない2以上の蛋白質において、あるアミノ酸残基または領域が等価の生物学的または生化学的機能を有することを表す。例えば、*Acinetobacter calcoaceticus* 以外の生物に由来する水溶性PQQGDHにおいて、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から206残基の領域とアミノ酸配列類似性の高い領域が存在し、かつ蛋白質の二次構造から見て該領域がその蛋白質において同じ役割を果たしていると合理的に考えられる場合、該領域は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から206残基の領域と同等の領域」と言われる。さらに、該領域の第7番目のアミノ酸残基は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第192残基と同等の位置のアミノ酸残基」と言われる。

【0013】

好ましくは、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの192番目のグルタミン残基もしくは193番目のロイシン残基、または他の種における同等の位置のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。

【0014】

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基は、アラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている。

【0015】

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基と167番目のアスパラギン酸残基が同時に他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基は、アラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている。また好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されている。

【0016】

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されているグルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されている。また好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基がグルタミン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている。

【0017】

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で置換されている。また好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基、グリシン残基、グルタミン酸残基、ロイシン残基、フェニルアラニン残基、セリン残基、またはアスパラギン酸残基で置換されており、かつ452番目のアスパラギン残基がトレオニン残基で置換されている。

【0018】

本発明の別の態様においては、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の193番目のロイシン残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素が提供される。好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の193番目のロイシン残基がアラニン残基またはグリシン残基で置換されている。

【0019】

また別の観点においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、配列：Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

（式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がGlnであるときXaa2はLeuではない）を含む。好ましくはXaa1はAla、Gly、Glu、Leu、Phe、SerまたはAspであり、Xaa2はAlaまたはGlyである。

【0020】

本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサ

ーを提供する。

【0021】

本発明の改変型グルコース脱水素酵素の酵素蛋白質はグルコースに対して高い選択性を示し、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高選択性かつ高感度の測定に応用することができる。

【0022】

【発明の実施の形態】

改変型PQQGDHの構造

【0023】

本発明の好ましい改変型グルコース脱水素酵素においては、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の192番目のグルタミン残基がアラニン残基またはグリシン残基で置換されているか、または193番目のロイシン残基がアラニン残基またはグリシン残基で置換されている。

【0024】

また別の態様においては、本発明の改変型PQQGDHは、上述の置換に加えて、配列番号1で表されるアミノ酸配列の167番目のアスパラギン酸残基が同時に他のアミノ酸残基で、特に好ましくはグルタミン酸残基で置換されている。また好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、上述の置換に加えて、452番目のアスパラギン残基が他のアミノ酸残基で、特に好ましくはトレオニン残基で置換されている。167番目のアスパラギン酸残基および452番目のアスパラギン残基がPQQGDHによる基質の認識および結合に関与することは、それぞれ特開2001-346587および特開2001-197888に記載されている。しかし、一般的には、異なるドメインに存在するアミノ酸残基に同時に変異を導入することにより、基質の選択性や酵素活性がどのように変化するかについては、全く予測することができない。場合によっては、酵素活性が全く失われることもある。したがって、本発明において、これらの変異を同時に導入することによりグルコースの

選択性の向上が得られたことは、驚くべき発見であった。

【0025】

また別の観点においては、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、配列：
Gly-Arg-Asn-Xaa1-Xaa2-Ala-Tyr-Leu

（式中、Xaa1、Xaa2、は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1がGlnであるときXaa2はLeuではない）を含む。好ましくはXaa1はAla、Gly、Glu、Leu、Phe、SerまたはAsnであり、Xaa2はAlaまたはGlyである。

【0026】

改変型PQQGDHの製造方法

Acinetobacter calcoaceticus 由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、置換すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列を、所望のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が、当該技術分野において知られており、例えば、Sambrookら，“Molecular Cloning; A Laboratory Manual”，第2版，1989，Cold Spring Harbor Laboratory Press，New Yorkに記載されている。

【0027】

このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

【0028】

本発明の改変型PQQGDHにおいては、所望のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野においてよく知られている。

【0029】

さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、蛋白質の一次構造を並列して比較すること、あるいは当該酵素の一次構造をもとに予測された二次構造を比較することにより、Acinetobacter calcoaceticus由来の水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域と同等の領域を容易に認識することができ、本発明にしたがって、この領域中のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、グルコース選択性の向上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。これらの改変型グルコース脱水素酵素も本発明の範囲内である。

【0030】

上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の改変型PQQGDHを調製する。

【0031】

酵素活性の測定方法

本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2, 6-ジクロロフェノールイソドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

【0032】

グルコースに対する選択性

本発明のPQQGDHのグルコースに対する選択性は、基質として、2-デオ

キシーグルコース、マンノース、アロース、3-0-メチルグルコース、ガラクトース、キシロース、ラクトースおよびマルトース等の各種の糖を用いて上述のように酵素活性を測定し、グルコースを基質としたときの活性に対する相対活性を調べることにより評価することができる。

【0033】

本発明の改変型PQQGDHは野生型酵素と比較して、グルコースに対する選択性が向上しており、特にマルトースに対する反応性と比較してグルコースに対する反応性が高い。したがって、本改変型酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーはグルコース測定に関して選択性が高く、種々の糖が存在する試料においても高感度でグルコースが検出できるという利点を有する。

【0034】

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリプレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

【0035】

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定

あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをプロッキングする。

【0036】

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl₂、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

【0037】

【実施例】

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0038】

実施例1

改変型酵素PQQGDH遺伝子の構築

配列番号2に示されるAcinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、変異の導入を行った。プラスミドpGB2は、ベクターpTrc99A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、Acinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHをコードする構造遺伝子を挿入したものである（図1）。常法に従って部位特異的変異法により192番目のグルタミン残基または193番目のロイシン残基をコードする塩基配列

を、それぞれアラニン残基またはグリシン残基をコードする塩基配列に置換した。さらに、167番目のアスパラギン酸残基または452番目のアスパラギン残基をコードする塩基配列を、それぞれグルタミン酸残基またはグリシン残基をコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を表1に示す。2カ所の変異を有する変異体を作成するためには、2種類のオリゴヌクレオチドターゲットプライマーを同時に用いて上記と同様に変異を導入した。

【表1】

Gln192Ala	5'-ata agc aag cgg gtt acg ccc -3'
Gln192Gly	5'-caa ata agc aag ccc gtt acg ccc ttg -3'
Gln192Leu	5'-caa ata agc aag cag gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Phe	5'-caa ata agc aag aaa gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Ser	5'-caa ata agc aag gct gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Asn	5'-caa ata agc aag gtt gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Asp	5'-caa ata agc aag atc gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Glu	5'-caa ata agc aag ttc gtt acg ccc ttg-3'
Gln192Lys	5'-caa ata agc aag ttt gtt acg ccc ttg-3'
Leu193Ala	5'-caa ata agc agc ctg gtt acg -3'
Leu193Gly	5'-gaa caa ata agc acc ctg gtt acg ccc -3'
Asp167Glu	5'-cc tga ctg atg ttc ttt tga tga agg -3'
Asn452Thr	5'-c atc ttt ttg gac agt tcc ggc agt at -3'

【0039】

ベクタープラスミドpKF18k（宝酒造（株））にAcinetobacter calcoaceticus由来PQQGDHをコードする遺伝子の一部を含むKpn I-Hind III断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート50fmolと宝酒造（株）製Mutant（登録商標）-Express Kmキットに付属のセレクションプライマー5pmol、リン酸化したターゲットプライマー50pmolを全体（20μl）の1/10量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100℃、3分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1本鎖にした。セレクションプライマーはpKF18kのカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを5分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに3μlの同キットエクステンションバッファー

一、 $1\mu\text{l}$ のT4 DNAリガーゼ、 $1\mu\text{l}$ のT4 DNAポリメラーゼおよび $5\mu\text{l}$ の滅菌水を加えて相補鎖を合成した。これをDNAのミスマッチ修復能欠損株であるE.coli BMH 71-18mutSに形質転換し、一晩振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。

【0040】

次に、ここから抽出したプラスミドをE.coli MV1184に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミドpGB2上の野生型PQQGDHをコードする遺伝子のKpn I-Hind III断片に入れ替え、改変型PQQGDHの遺伝子を構築した。

【0041】

実施例2

改変型酵素の調製

野生型または改変型PQQGDHをコードする遺伝子を、E. coli用の発現ベクターであるpTrc99A（ファルマシア社）のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドをE.coli DH5 α 株に形質転換した。これを450mlのL培地（アンピシリン $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、クロラムフェニコール $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有）で坂口フラスコを用いて37℃で一晩振とう培養し、1mM CaCl₂、 $500\mu\text{M}$ PQQを含む71のL培地に植菌した。培養開始後約3時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度0.3mMになるように添加し、その後1.5時間培養した。培養液から遠心分離（5000×g、10分、4℃）で菌体を回収し、この菌体を0.85%NaCl溶液で2回洗浄した。集菌した菌体をレンチプレスで破碎し、遠心分離（10000×g、15分、4℃）で未破碎の菌体を除去した。上清を超遠心分離（160500×g（40000r.p.m.）、90分、4℃）し、水溶性画分を得た。これを粗精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

【0042】

実施例3

酵素活性の測定

実施例2で得られた野生型および各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品をそれぞれ $1\ \mu\text{M}$ MPQQ、 1mM CaCl_2 存在下で1時間以上ホロ化した。これを $187\ \mu\text{l}$ ずつ分注し、 $3\ \mu\text{l}$ の活性試薬（ 6mM DCIP $48\ \mu\text{l}$ 、 600mM PMS $8\ \mu\text{l}$ 、 10mM リン酸緩衝液pH7.0 $16\ \mu\text{l}$ ）および各濃度のD-グルコース溶液 $10\ \mu\text{l}$ を加え、酵素活性を測定した。

【0043】

酵素活性の測定は、室温において、 10mM MOPS- NaOH 緩衝液（pH7.0）中においてPMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）を用い、DCIPの 600nm の吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に $1\ \mu\text{mol}$ のDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH7.0におけるモル吸光係数は 16.3mM^{-1} とした。

【0044】

基質濃度対酵素活性のプロットから、 K_m を求めた。結果を表2に示す。

【表2】

	グルコースに対する K_m 値(mM)	V_{max} (U/mg)
野生型	30	129
Gln192Ala	50	123
Gln192Gly	36	94
Leu193Gly	177	42
Leu193Gly	157	46

【0045】

実施例4

基質特異性の評価

各改変型酵素の粗精製酵素標品について基質特異性を調べた。実施例2で得られた野生型および各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品をそれぞれ $1\ \mu\text{M}$ MPQQ、 1mM CaCl_2 存在下で1時間以上ホロ化した。これを $187\ \mu\text{l}$ ずつ分注し、 $3\ \mu\text{l}$ の活性試薬（ 6mM DCIP、 600mM PMS、 10mM

リン酸緩衝液pH7.0を含む）および基質を加えた。基質として、それぞれ終濃度20mMまたは100mMとなるように400mMのグルコースまたは他の糖を加え、室温で30分間インキュベートして、実施例3と同様に酵素活性を測定した。値はグルコースを基質としたときの活性を100%とし、これに対する相対活性で表した。結果を表3-5に示す。

【0046】

【表3】

	野生型	Gln192Ala	Gln192Gly	Leu193Ala	Leu193Gly
基質濃度	20mM	20mM	20mM	20mM	20mM
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
アロース	45	29	34	50	39
3-O-m-グルコース	82	80	101	66	60
ガラクトース	8	10	12	34	26
マルトース	49	20	24	39	30
ラクトース	53	56	40	64	56
セロビオース	85	138	85	84	71

【0047】

【表4】

	野生型	Gln192Ala	Gln192Gly	Leu193Ala	Leu193Gly
基質濃度	100mM	100mM	100mM	100mM	100mM
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
アロース	62	41	45	47	35
3-O-m-グルコース	92	93	98	86	59
ガラクトース	8	6	19	25	17
マルトース	51	56	44	50	46
ラクトース	51	56	44	50	46
セロビオース	42	73	59	59	39

【0048】

【表5】

	野生型	Gln192Leu	Gln192Phe	Gln192Ser	Gln192Asp	Gln192Glu
基質濃度	20mM	100mM	20mM	20mM	20mM	20mM
グルコース	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)	100(%)
2-デオキシグルコース	0	5	0	0	2	0
マンノース	7	9	0	2	5	0
アロース	41	65	70	78	31	41
3-O- α -グルコース	80	97	84	90	62	89
ガラクトース	8	6	23	20	61	19
キシロース	5	8	17	26	28	7
ラクトース	58	59	63	54	105	66
マルトース	67	55	55	36	31	35
セロビオース	85	44	90	55	-	-
					148	82
						-

【0049】

また、二重変異を有する本発明の改変型酵素を用いて、酵素活性を測定した結果を表6-7に示す。本発明の改変型酵素はいずれも、マルトースに対する反応性と比較してグルコースに対する高い反応性を示した。

【0050】

【表6】

	Asp167Glu/A sn452Thr	Gln192Gly/A sn452Thr
基質濃度	20mM	20mM
	100(%)	100(%)
	2	32
	4	98
	2	14
	12	46
	2	21

【0051】

【表7】

	野生型		Asp167Glu/ Leu192Asp		Asp167Glu/ Leu192Gly		Asp167 Glu/Gln 192Leu		Asp167Glu/ Gln192Ser		Asp167Glu/ Gln192Asn		Asp167Glu/ Glu/Gln 192Leu	
基質濃度	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM	20mM	100mM
グルコース	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-デオキシグルコース	7	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
マンノース	41	65	6	5	6	7	2	1	0	0	2	16	26	5
アロース	80	97	2	4	6	8	2	0	0	0	9	14	6	35
3-O-ア-グルコース	8	6	5	7	1	4	21	3	0	10	12	9	70	8
ガラクトース	5	8	0	1	0	0	5	0	0	3	9	2	9	9
ギリコース	58	59	58	61	50	43	57	61	43	49	44	54	90	90
ラクトース	67	55	11	11	1	5	22	6	3	42	40	16	49	49
マルトース	85	44	-	107	215	130	195	240	131	-	61	-	74	74

【0052】

実施例5

基質濃度依存性

本発明の改変型PQQGDHの活性の基質濃度依存性を調べた。各改変型酵素を、 $1\ \mu\text{M}$ PQQ、 $1\ \text{mM}$ CaCl_2 存在下で1時間以上ホロ化し、各種濃度のグルコースおよび $5\ \mu\text{M}$ PQQ、 $10\ \text{mM}$ CaCl_2 存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例3に記載の酵素活性の測定法に準じ、DCIPの $600\ \text{nm}$ の吸光度の変化を指標とした。結果を図3に示す。本発明の改変型PQQGDHは、野生型と比較して高いグルコース濃度において飽和する。また、いずれもグルコース濃度 $200\ \text{mM}$ まで基質阻害が見られず、 K_{si} は $200\ \text{mM}$ 以上であった。

【0053】

実施例6

酵素の精製

実施例2で得られた野生型およびGln192Asp粗精製酵素をそれぞれ $10\ \text{mM}$ リン酸緩衝液pH7.0で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSKgel CM-TOYOPEARL 650M（東ソー株式会社）に吸着させた。このカラムを $10\ \text{mM}$ リン酸緩衝液pH7.0、 $750\ \text{ml}$ で洗浄した後、 $0-0.2\ \text{M}\ \text{NaCl}$ を含む $10\ \text{mM}$ リン酸緩衝液pH7.0を用い、酵素を溶出させた。流速は $5\ \text{ml}/\text{min}$ で行った。GDH活性を有する画分を回収し、 $10\ \text{mM}\ \text{MOPS-NaOH}$ 緩衝液（pH7.0）で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変型PQQGDH蛋白質を得た。得られた精製酵素標品について、各基質に対する酵素活性を測定した。結果を表8に示す。

【0054】

【表8】

	野生型				Glu192Asp			
	Km (mM)	Vmax (U/mg)	kcat (sec ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ ·sec ⁻¹)	Km (mM)	Vmax (U/mg)	kcat (sec ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ ·sec ⁻¹)
グルコース	25.0	4610	3860	154(100%)	50.0	475	398	8.0(100%)
アロース	35.5	2897	2509	71(46%)	57.2	226	189	3.3(42%)
3-O-m-グルコース	28.7	3596	3011	105(68%)	64.4	310	260	4.0(51%)
ガラクトース	5.3	277	232	44(29%)	118.9	137	115	1.0(12%)
ラクトース	18.9	1982	1659	88(57%)	75.0	390	327	4.4(54%)
マルトース	26.0	2305	1930	74(48%)	95.8	77	64	0.7(8%)

【0055】

【表9】

Asp167Glu/Asn452Thr			
	Km (mM)	kcat (sec ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ ·sec ⁻¹)
グルコース	48	1193	25(100%)
アロース	182	73	0.4(2%)
3-O-m-グルコース	198	215	1.1(4%)
ガラクトース	145	89	0.6(2%)
ラクトース	55	167	3(12%)
マルトース	147	65	0.4(2%)
セロビオース	16	226	14(56%)

【0056】

実施例7

酵素センサーの作製および評価

5ユニットのGln192A1a改変型酵素にカーボンペースト20mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約40mg充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で30分間処理した後、20mMリジンを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で20分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で1時間以上平衡化させた。電極は4℃で保存した。

【0057】

作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の改変型PQQGDHを固定化した酵素センサーを用いて、0.1mM-5mMの範囲でグルコースの定量を行うことができた。

【0058】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Sode, Koji

<120> Glucose Dehydrogenase

<130> psg0018

<150> JP 2002-196177

<151> 2002-07-04

<160> 9

<210> 1

<211> 454

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 1

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn

1

5

10

15

Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu

20

25

30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly

35

40

45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe

50

55

60

Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu

65

70

75

80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile

85

90

95

Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn

100

105

110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu

115

120

125

Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His

130	135	140
Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr		
145	150	155
Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn		
165	170	175
Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr		
180	185	190
His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile		
195	200	205
Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr		
210	215	220
Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys		
225	230	235
Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu		
245	250	255
Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys		
260	265	270
Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys		
275	280	285
Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val		
290	295	300
Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro		
305	310	315
Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro		
325	330	335
Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser		
340	345	350
Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu		
355	360	365

Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile
370 375 380

Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met
385 390 395 400

Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly
405 410 415

Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp
420 425 430

Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys
435 440 445

Phe Thr Tyr Lys Ala Lys

450

<210> 2

<211> 1612

<212> DNA

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 2

agctactttt atgcaacaga gcctttcaga aat tagatt ttaat tagatt cgttattcat 60
cataatacaa atcatataga gaactcgtac aaaccctta ttagagggtt aaaaattctc 120
ggaaaatttt gacaatttt aaggtggaca catgaataaa catttattgg ctaaaattgc 180
tttattaaggc gctgttcagc tagttacact ctcagcattt gctgatgttc ctctaactcc 240
atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa cttagacaag aaagttattc tatctaattct 300
aaataagccg catgcttgt tatggggacc agataatcaa atttggtaa ctgagcgagc 360
aacaggtaag attctaagag ttaatccaga gtcgggtagt gtaaaaacag ttttcaggt 420
accagagatt gtcaatgatg ctgatggca gaatggttt ttaggtttt cttccatcc 480
tgattttaaa aataatcctt atatctat ttcaggtaca tttaaaaatc cggaaatctac 540
agataaaagaa ttaccgaacc aaacgattat tcgtcggtt acctataata aatcaacaga 600
tacgctcgag aagccagtcg atttattagc aggattacct tcatcaaaag accatcagtc 660
aggcgtctt gtcattggc cagatcaaaa gatttattt acgattggtg accaaggcg 720

taaccagctt gcttatttgt tcggccaaa tcaagcacaa catacgccaa ctcaacaaga 780
actgaatggt aaagactatc acacctata gggtaaagta ctacgcttaa atcttgatgg 840
aagtattcca aaggataatc caagtttaa cggggtggtt agccatattt atacacttgg 900
acatcgtaat ccgcagggt tagcattcac tccaaatggt aaattattgc agtctgaaca 960
aggcccaaac tctgacgatg aaattaacct cattgtcaaa ggtggcaatt atggttggcc 1020
aatgttagca ggttataaag atgatagtgg ctatgcttat gcaaatttatt cagcagcagc 1080
caataagtca attaaggatt tagctaaaaa tggagtaaaa gtagccgcag gggccctgt 1140
gacgaaagaa tctgaatgga ctggtaaaaaa cttgtccca ccattaaaaa ctttatatac 1200
cggtcaagat acctacaact ataacgatcc aacttgttgg aagatgaccc acatttgctg 1260
gccaacagtt gcaccgtcat ctgcctatgt ctataagggc ggtaaaaaaag caattactgg 1320
ttgggaaaat acattattgg ttccatcttt aaaacgtggt gtcatttcc gtattaagtt 1380
agatccaact tatagcacta cttatgtga cgctgtaccg atgtttaaga gcaacaaccg 1440
ttatcgat gtgattgcaa gtccagatgg gaatgtctt tatgtattaa ctgatactgc 1500
cgaaaaatgtc caaaaagatg atggctcagt aacaaataca ttagaaaaacc caggatctct 1560
cattaagttc acctataagg ctaagtaata cagtcgcatt aaaaaaccga tc 1612

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<220>

<222> 4

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 5

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 3

Gly Arg Asn Xaa Xaa Ala Tyr Leu

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 4

ataaggcaagg gggttacgc cc 22

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 5

caaataaggca agcccggtac gcccttg 27

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 6

caaataaggca gcctgggtac g 21

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 7

gaacaaataaa gcaccctgggt tacgccc 27

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 8

cctgactgat gttctttga tgaagg 26

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 9

catcttttg gacagttccg gcagtat 27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 10

caaataagca agcaggttac gcccttg 27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 11

caaataagca agaaagttac gcccttg 27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 12

caaataagca aggctgttac gcccttg 27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 13

caaataagca aggttgttac gcccttg 27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 14

caaataagca agatcggttac gcccttg 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 15

caaataagca agttcgttac gcccttg 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 16

caaataagca agtttgttac gcccttg 27

【図面の簡単な説明】

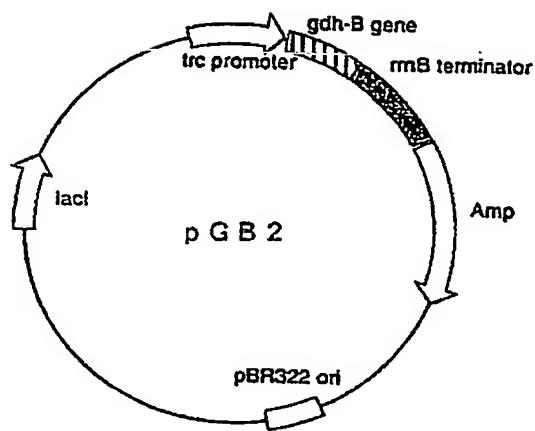
【図1】 図1は、本発明の改変型PQQGDHをコードする突然変異遺伝子を作成するために用いたプラスミドpGB2の構造を示す。

【図2】 図2は、本発明の改変型PQQGDHをコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示す。

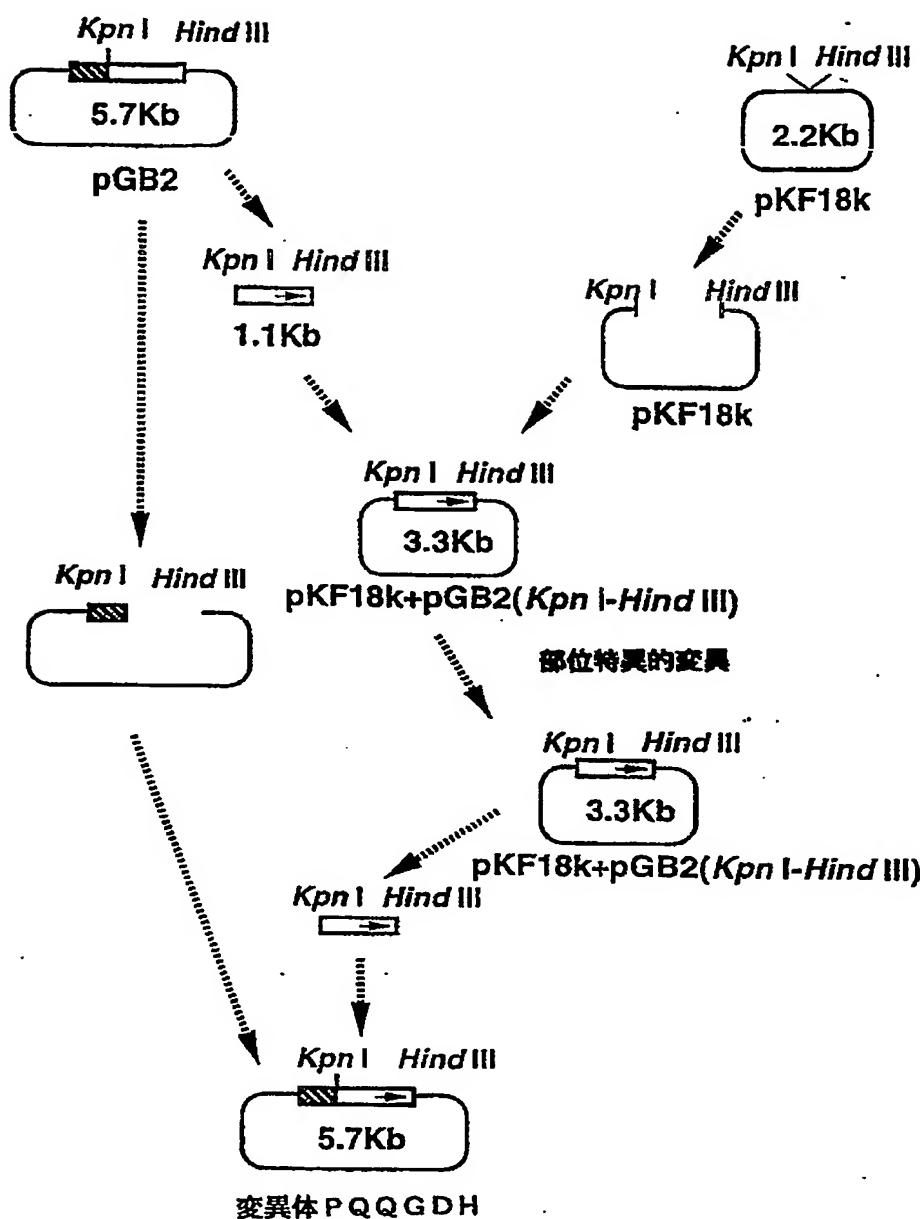
【図3】 図3は、本発明の改変型PQQGDHの活性の基質濃度依存性を示すグラフである。

【書類名】 図面

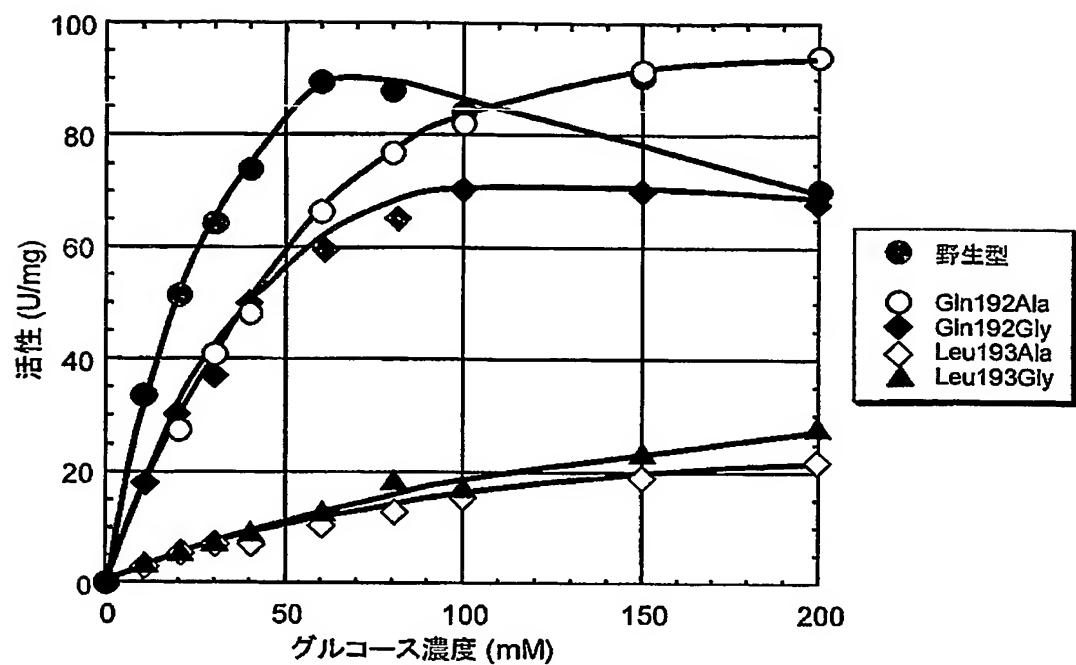
【図1】



【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 グルコースに対する選択性が高い改変型水溶性PQQGDHを提供すること。

【解決手段】 本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第186残基から第206残基の領域または他の種における同等の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素を提供する。本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

【選択図】 なし

特願 2003-071760

出願人履歴情報

識別番号

[596153357]

1. 変更年月日 1996年10月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都目黒区南1-13-16
氏名 早出 広司